

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-92968

(43) 公開日 平成6年(1994)4月5日

(51) Int.Cl.⁵
C 0 7 D 495/04

識別記号 庁内整理番号
103 Z 9165-1C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数1(全8頁)

(21) 出願番号 特願平4-246112

(22) 出願日 平成4年(1992)9月16日

(71) 出願人 391012730
ナカライトスク株式会社

京都府京都市中京区二条通烏丸西入東下屋
町498番地

(72) 発明者 稲川 淳一
京都府向日市鶴冠井町石橋17番地 ナカラ
イトスク株式会社研究所内

(74) 代理人 弁理士 池内 寛幸 (外1名)

(54) 【発明の名称】 ピオチン導入試薬

(57) 【要約】

【目的】 短時間で、効率よく、核酸および／またはタンパク質にピオチンを標識することのできるピオチン導入試薬を提供する。

【構成】 D-ピオチンおよびN-ヒドロキシスクシンイミドにN₁-ジシクロヘキシルカルボジイミドを添加し反応させ、ピオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミドを得る。これをアミノペンタノールと反応させ、ピオチン-アミノペンタノールを得て、酸化し、ピオチン-アミノペンタナールから成るピオチン導入試薬を得る。

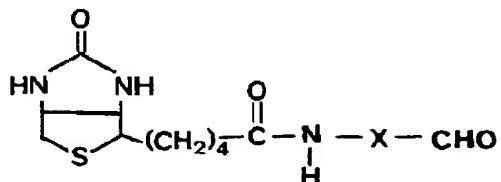
1

2

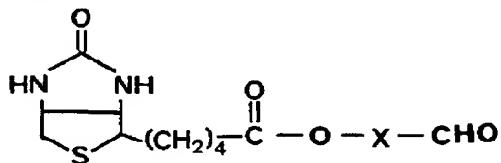
【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(化1)または(化2)で示される化合物から成る核酸またはタンパク質へのビオチン導入試薬。

【化1】



【化2】



但し、(化1)または(化2)において、Xは主鎖の炭素原子数が4~16で側鎖に炭素原子数が10以下の分岐を有していてもよい脂肪族炭化水素基、もしくは、これらの脂肪族炭化水素基の2つがアミド結合またはエステル結合により結合している基を表す。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、核酸またはタンパク質へのビオチン導入試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】核酸〔デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)〕の検出は、一般に、試料の核酸を1本鎖に変性した後、ニトロセルロース膜などの固相に固定し、これに目的の塩基配列と相補的な塩基配列を有する標識した核酸を、ハイブリッド(複合体)形成条件下で接触させ、結果として結合した標識物質を測定することにより、ハイブリット形成の有無を確認することで行われてきた。つまり標識した核酸は、核酸検出に欠くことのできない物である。以上の既存技術に関する詳細は、文献〔メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)6巻、1979年、モレキュラー・クローニング、1989年〕などに記載されている。

【0003】従来、核酸の標識は、標識物質として、³²P、¹⁴Cあるいは³Hなどの放射性同位体が用いられ、ニックトランスレーション法〔ジャーナル・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)113, 237, 1977. Rigby P.W.S.〕により核酸への組み込みが行われて来た。

【0004】放射性同位体を標識した核酸を用いる検出法は、高感度ではあるが、安全性と経済性の問題が指摘されている。つまり、一般的に放射性同位体は人体に有害であり、使用には特別に教育された技術者と専用施設が必要であり、廃棄物の取扱にも注意を要する。また、

放射性同位体は、半減期を考慮して保存・使用する必要がある。これらの点を補うために、非放射性の核酸標識法とその検出法の開発が盛んに行われている。

【0005】核酸の非放射性標識法は、大別して、標識物を核酸に直接に結合させる直接法と、特異的結合性の強い2物質の一方を核酸に結合し、後に標識物を結合した他方を反応させる間接法に分類できる。

【0006】間接法としては、ビオチン・アビジンの特異的結合性を応用したビオチン標識核酸の使用が主であり、ビオチン標識核酸の調製は、ビオチン化スクレオチドをニックトランスレーション法により、核酸に組み込む方法が一般的である。ハイブリッド形成後の検出は、例えば、酵素標識したアビジンをハイブリッドのビオチンに接触させ、アビジン・ビオチン結合を介してハイブリッドに酵素を結合し、酵素の活性を測定することで行う。

【0007】また、光学活性のアジド基誘導体を用いたビオチン標識法も開発されている。標識物質としては、フォトビオチン(Photobiotin)が用いられ、市販品〔ブレサ(BRESA)社、フォトビオチンR(Photobiotin R)〕もある。

【0008】さらに、ビオチンヒドラジド誘導体や、ビオチンスペルミン誘導体などのように、側鎖にアミノ基を有するビオチン誘導体をグルタルアルデヒドやジエポキシオクタジなどのような二価性架橋剤を用いて、核酸塩基と結合させる試みもなされている〔特開平1-228500号、アルーハキン・エー・エッチラ(AL-Hakim A.H., et al)バイオケミカル・ジャーナル(Biochemical J)251巻、935ページ、1988年〕。

【0009】また、核酸の重合体や断片を作らない優れたビオチン導入試薬として、ビオチニアミノカブロイル-N-ヒドロキシスクシンイミドも知られている。一方、核酸と同様に、ビオチン・アビジンの特異的結合は、酵素免疫測定法(EIA)やタンパク質糖鎖分析に応用され、汎用されている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】前述した、ニックトランスレーション法は、核酸の標識に酵素反応を用いており、標識時間が長いこと(例えば約90分間)、正確な温度管理(15°C付近)が必要なこと、1本鎖核酸の標識が不可能なこと、標識後に細かい核酸断片が生成することなどの問題がある。

【0011】また、光学活性のアジド基誘導体を用いたビオチン標識法については、アジド基誘導体は、光感受性が高いため、弱光下で操作する必要があり、反応時間も40~60分間程度必要である。

【0012】さらに、ビオチンヒドラジド誘導体や、ビオチンスペルミン誘導体などにより、側鎖にアミノ基を有するビオチン誘導体を二価性架橋剤を用いて、核酸塩基と結合させる方法は、二価性架橋剤の使用により、

3

ハイブリダイゼーション（複合体形成）の特異性低下の原因となる核酸塩基同士の架橋が生じやすいと言う問題がある。

【0013】また、ビオチンーアミノカブロイルーN-ヒドロキシスルシンイミドは、核酸の重合体や断片を作らない優れたビオチン導入試薬であるが、反応時間は、2時間から一昼夜必要であり、短時間（10分程度）では標識が十分に行えないと言う問題がある。

【0014】また、核酸と同様に、ビオチン・アビジンの特異的結合は、酵素免疫測定法（EIA）やタンパク質糖鎖分析に応用され、汎用されているが、この場合に用いるビオチン標識抗体やビオチン標識レクチンの調製においても、グルタルアルデヒドのような二価性架橋剤を用いた標識方法では、抗体やレクチンの重合体が形成され、標識効率低下の原因となる。つまり、タンパク質の標識においても、核酸の標識と同様な問題がある。

【0015】特に最近は、非放射性の核酸やタンパク質の検出法が普及するに従って、簡易な標識操作にて、効率良くビオチンを標識することのできる試薬が望まれている。

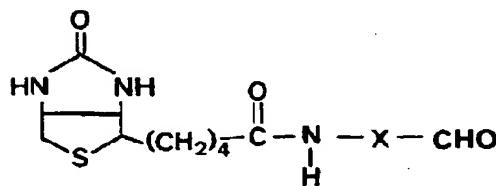
【0016】本発明は、特別な反応条件を必要とせず、短時間で、効率よく、核酸および／またはタンパク質にビオチンを標識することのできるビオチン導入試薬を提供することを目的とする。

【0017】
【課題を解決するための手段】本発明者は、簡便な核酸およびタンパク質のビオチン導入法に関して鋭意研究を重ねた結果、アミノ基とホルミル基がシップ塩基を形成し、さらなる還元により、安定な共有結合に転移することを応用し、短時間で効率よくビオチン標識のできるビオチン導入試薬を発明するに至った。

【0018】すなわち、前記本発明の目的を達成するため、本発明の核酸またはタンパク質へのビオチン導入試薬は、下記一般式（化1）または（化2）で示される化合物から成る。

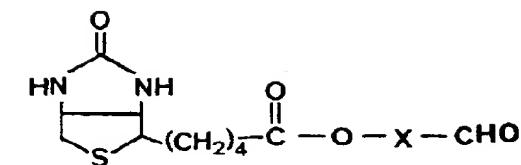
【0019】

【化3】



【0020】

【化4】



【0021】但し、（化3）または（化4）において、Xは主鎖の炭素原子数が4～16で側鎖に炭素原子数が10以下の分岐を有していてもよい脂肪族炭化水素基、もしくは、これらの脂肪族炭化水素基の2つがアミド結合またはエステル結合により結合している基を表す。

【0022】以下、本発明に関して詳細に述べるが、以下に挙げる物質および方法に限定されるものではない。ここで以下に記述する用語について解説する。プローブとは、検出目的の核酸塩基配列と相補性を有する標識した核酸断片を示し、ハイブリダイゼーションとは、検出目的の核酸配列とプローブを接触させて、その相補性により結合させる操作を指す。また、ハイブリッドとは、ハイブリダイゼーションで生じた核酸配列同士の複合体を指す。

【0023】ビオチン標識した核酸やタンパク質は、一般的に以下の様に用いられる。すなわち、固相担体に固定した核酸とビオチン標識したプローブを接触させ、ハイブリダイゼーションを行った後、未反応のビオチン標識したプローブを洗浄除去する。更に標識したアビジンをこれに接触させ、固相担体に固定した核酸と結合しているプローブのビオチンに、ビオチン・アビジン複合体を形成させることで、標識物を結合し、この標識物を適当な方法で検出する方法である。

【0024】また、酵素免疫測定法（EIA）の場合は、抗体を結合した固相担体で目的物を補足し、ビオチン標識抗体を接触させて目的物にビオチンを結合させる。タンパク質糖鎖分析の場合は、固相担体にタンパク質を固定し、ビオチン標識レクチンを接触させて目的の糖鎖にビオチンを結合し、以後は核酸と同様の検出法で行うことができる。これらの検出方法は、ビオチン・アビジン複合体の結合定数が、10¹⁵ モル⁻¹ときわめて高いこと〔グリーン・エヌ・エム（Green,N.M.）、アドバンス・イン・プロテイン・ケミストリー（Adv. Prote in Chem.）29巻、85ページ、1975年〕、アビジンが4ヵ所のビオチン結合部位を持つことをを利用して高感度検出を可能にしたものである。以上のように、ビオチン標識した核酸やタンパク質は、高感度検出法に欠くことのできないものであり、簡易な操作でビオチン標識できるビオチン導入試薬が望まれている。

【0025】本発明のビオチン導入試薬の特徴は、特別な反応条件を必要とせず、ビオチン標識効率が高く、かつ反応時間が極めて短いことである。本発明のビオチン導入試薬の合成反応は、前記（化3）で示される化合物の場合には、適当な溶媒、例えばN,N-ジメチルホル

ムアミドなどの中において、N, N-ジシクロヘキシカルボジイミドなどの縮合剤の存在下で、ビオチンにN-ヒドロキシスクシンイミドを加えて反応させ（反応は、例えば室温で攪拌する方法など）、ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドとし、次いでこれに所定のアミノアルコール [H₂-N-X-CH₂-OH: 但し、Xは（化3）のXと同じ基を表す。] を当モルまたは過剰に加えて反応させ（反応は、例えば室温で攪拌する方法など）、ビオチンとアミノアルコールがアミド基で結合した誘導体とし、次いで、得られた誘導体の末端のOH基を適度の酸化条件下で酸化させてホルミル化することにより、容易に行なうことができる。

【0026】また、前記（化4）で示される化合物の場合には、適當な溶媒、例えばN, N-ジメチルホルムアミドなどの存在下で、ビオチンに所定のジオール [HO-X-CH₂-OH: 但し、Xは（化4）のXと同じ基を表す。] を大過剰（例えば5倍モル程度）加え、必要なエステル化触媒（酸触媒など）を加えて加熱還流させてエステル化し、前記ジオールの一方のOH基がエステル結合を形成してビオチンと結合した誘導体とし、得られた誘導体の末端のOH基を適度の酸化条件下で酸化させてホルミル化することにより、容易に合成することができる。

【0027】前記（化3）の化合物の合成反応で用いるアミノアルコールとしては、前記化学式で示したアミノアルコールが使用されるが、中でも、5-アミノ-1-ペンタノール、4-アミノ-1-ブタノール、3-アミノ-1-ブロパノール等が好ましく、特に、スペーサー基の炭素鎖を延長する効率から考えて、5-アミノ-1-ペンタノールや6-アミノ-1-ヘキサノールなどが好ましく用いられる。

【0028】また、前記（化4）の化合物の合成反応で用いるジオールとしては、前記化学式で示したジオールが使用されるが、中でも、1, 6-ヘキサンジオール、1, 5-ペンタンジオール、1, 4-ブantanジオール、1, 3-ブロバンジオール等が好ましく、特に、スペーサー基の炭素鎖を延長する効率から考えて、1, 6-ヘキサンジオールが好ましく用いられる。

【0029】本発明のビオチン導入試薬のビオチン分子とホルミル基との間のスペーサー基の長さは、主鎖の炭素数で、4から32原子が好ましい。スペーサー基は、炭素、酸素あるいは空素原子を含有する分子から構成され、例えば5-アミノ-1-ペントナールのように、直鎖であることが好ましい。主鎖の炭素数で32原子より大きな長さのスペーサー基を用いることもできるが、より良い効果は期待できない。また、主鎖の炭素数で1原子より小さな長さのスペーサー基とした場合には、DNAなどとの立体障害のため、効率のよい標識化ができなくなる。

【0030】尚、分岐鎖を導入したものをスペーサー基

として用いることもできる。この場合には側鎖の炭素数は、10以下にすることが好ましい。ビオチン分子とスペーサー基との結合は、特にエステル結合、アミド結合またはエーテル結合などで形成することができる。

【0031】本発明のビオチン導入試薬の理解を助けるものとして、以下にビオチン導入試薬の使用法、ビオチン標識核酸の検出法そして標識対象について例示するが、これらの方や物質に限定されるものではない。

【0032】核酸をビオチン標識する場合、以上的方法により合成したビオチン導入試薬を1本鎖の核酸と混合し、好ましくは37°Cで10分間反応させることで標識を完了させることができる。また、この反応は、室温で行うことができる。核酸の塩基同士の架橋など不都合な反応は起こらない為、反応時間を延長しても支障は無い。

【0033】この結合は、水素化ほう素ナトリウム等の還元剤を添加して、より安定な共有結合にすることもできる。この場合、標識後のさらなる熱変性が可能である。ビオチン導入試薬と核酸の反応は、種々緩衝液中で行なうことができるが、トリス緩衝液などのアミノ基を含有する緩衝液の使用は適さない。

【0034】作成したビオチン標識プローブは、エタノール沈澱、“セファデクスG-50”（ファルマシア社製、ゲル滲過クロマトグラフィー用担体）による分画、あるいは電気泳動等の各種の方法で精製することが可能である。作成したビオチン標識プローブは、そのままハイブリダイゼーションに用いることができる。また、-20°Cにて保存することも可能である。

【0035】検出する核酸またはタンパク質は、動物、植物、微生物等のすべての由来のものが使用できる。1本鎖に変性した核酸を固定する固相担体としては、たとえば、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、アミノベンジルオキシメチル（ABM）膜、セルロース膜、変性セルロース膜、ポリビニリジン・ジフルオライド（PVDF）膜等が挙げられるが、これらに限定される物ではない。

【0036】検出する核酸を、固相に固定する方法は、公知の方法が使用できる「マニアティス・エム（Manatis, M.）ら、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）1989年」。たとえば、サザンプロティング、ドットプロティング、In situ プロッティング、コロニープラーカプロッティングなどが使用できる。

【0037】固相に固定した検出する核酸とビオチン標識プローブとのハイブリダイゼーションは、ビオチン標識プローブの長さおよび塩基組成（C+G%）などから最適と考えられるハイブリッド形成条件の溶液、ならびに温度で行なうことができる。非特異的吸着を抑えるために、デンハルト溶液、スキムミルク、ラウリル硫酸ナトリウム、あるいはラウリル硫酸ガルコシンなどを適宜添加することもできる。

【0038】ハイブリッド形成後のビオチン標識プロ-

ブの検出は、標識したアビジンなどを用いて検出するのが望ましい。アビジンの標識物は、酵素が好ましい。標識酵素としては、アルカリホスファターゼ、ペルオキダーゼ、 β -ガラクトシダーゼまたはグルコースオキシダーゼ等が使用できる。特に、アルカリホスファターゼが汎用され、アルカリホスファターゼの基質としては、5-ブロモ-4-クロル-3-インドリルホスフェート (BCIP) / 3, 3-(3, 3'-ジメトキシ-4-ジフェニル)-ビス-[5-フェニル-2-(4-ニトロフェニル)-テトラゾリウム] (ニトロブルーテトラゾリウム、NBT) 系により実施されるのが好ましいが、他のアルカリホスファターゼ基質系を用いても良い。

【0039】本発明の方法により標識可能な分析対象の核酸 (DNAあるいはRNA) あるいは、タンパク質としては、たとえば動物、植物、微生物等各種由来の全ての核酸またはタンパク質がいずれも例外なく挙げられる。

【0040】

【作用】本発明の核酸またはタンパク質へのビオチン導入試薬は、前記化学式 (化3) または (化4) で示される化合物からなるので、そのホルミル基が迅速に核酸やタンパク質のアミノ基と反応する性質を有する。すなわち、前記本発明のビオチン導入試薬は、ビオチン導入試薬のホルミル基が容易に核酸やタンパク質のアミノ基と反応し、シップ塩基を形成する。この塩基は水素化ほう素ナトリウムなどの還元剤により安定な共有結合となる。このシップ塩基の形成は、室温でも10分間程度で終了するため、ビオチン標識反応は短時間で完了する。また、グルタルアルデヒドの様な二価性架橋剤を用いた場合に発生するアミノ基同士の架橋反応が起こらないので、ビオチン標識効率が高い。従って短時間でのビオチンの導入効率が高く、一定量の核酸やタンパク質に、より多くのビオチンを導入する事ができる。

【0041】さらに、前記一般式 (化3) または (化4) で示されるように、ビオチニル基とホルミル基の間を結合しているスペーサー基として、特定の主鎖炭素原子数を有する基Xを含む特定長さのスペーサー基が存在するので、核酸やタンパク質の立体障害を回避して、ビオチンを効率よく核酸やタンパク質に導入し、標識する事ができる。

【0042】加えて、該導入試薬は、検出感度低下の原因となる酵素の重合体や核酸断片を產生しないので、高感度検出のためのビオチン標識核酸やビオチン標識タン

パク質の調製に適している。

【0043】

【実施例】以下に実施例を示し、本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例によりなんら限定されるものではない。

【0044】実施例1

ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド (Biotin-N-hydroxysuccinimide) の合成。

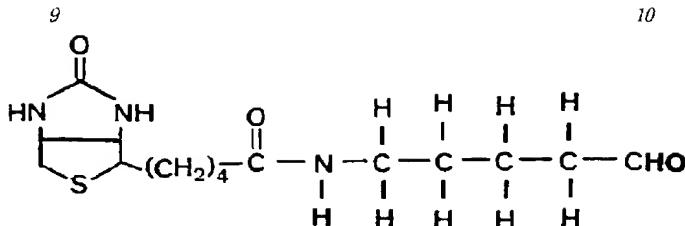
【0045】ベーカー (Backer et al.) の方法を用いて合成した [プロセーディング・ナショナル・アカデミック・オブ・サイエンス・オブ・U.S.A. (Proc. Acad. Sci. U.S.A.) 68, 2604-2607, 1971]。すなわち、D-ビオチン 1g およびN-ヒドロキシスクシンイミド 0.6g を溶解した N, N-ジメチルホルムアミド (12ml) に、N, N-ジシクロヘキシカルボジイミド (0.8g) を添加し、1昼夜室温で反応させた。生成したジシクロ尿素を濾別し、溶液を蒸発乾固した。さらに、エチルエーテルで洗浄し、2-プロパノールで再結晶して、ビオチニル-N-ヒドロキシスクシンイミドを得た。

【0046】実施例2

ビオチン-アミノペンタノール (Biotin-aminopentanol) の合成。実施例1で作成した、ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド (1g) を N, N-ジメチルホルムアミド (20ml) に溶解し、アミノペンタノール (0.384g) を添加し、さらに、トリエチルアミン (0.5ml) を含む N, N-ジメチルホルムアミド (5ml) を加え、1昼夜室温で反応させた。溶液を蒸発乾固し、2-プロパノールで再結晶して、ビオチニルアミノペンタノールを得た。さらに、これを酸化して、ビオチニルアミノペンタノールを生成した。すなわち、ビオチニルアミノペンタノール (0.329g) をジメチルスルホキシド (5ml) とベンゼン (5ml) の混合液に溶解し、これにピリジン (0.08ml) 、さらにトリフルオロ酢酸 (0.04ml) を添加し、最後に N, N-ジシクロヘキシカルボジイミド (0.617g) を加え、室温で18時間反応させた。反応終了後、ベンゼン (30ml) を添加し、室温で2時間攪拌した。生成したジシクロ尿素を濾別し、反応液を蒸発乾固した。これをメタノールに溶かし、シリカゲルクロマトグラフィー [溶出液：アセトニトリル (1.0) : メタノール (3)、但し、数字は容量割合を示す。] で精製して、本発明のビオチニルアミノペンタノールである下記化学式 (化5) で示されるビオチニルアミノペンタノールを得た。

【0047】

【化5】



【0048】実施例3

ビオチン-アミノカプロン酸-アミノペンタナル (Biotin-aminocaproyl-aminopentanal) の合成。

【0049】まず、実施例1で作成した、ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドから、コステロラ (Costello, et al.) の方法を用いて、ビオチン-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミド (Biotin-aminocaproyl-N-hydroxysuccinimide) を作成した [クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.), 25, 1572-1580, 1979]。

【0050】すなわち、ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド (1g) をN, N-ジメチルホルムアミド (8.8ml) に懸濁し、これにアミノカプロン酸 (0.385g) を含む0.1M 炭酸水素ナトリウム水溶液 (pH 8.0) 11.8ml を加え、室温で4時間反応させる。反応終了後、反応液を蒸発乾固し、残査を10%クエン酸水溶液で懸濁し、濾過した。結晶を氷冷した水で洗浄し、乾燥させた。これを、N, N-ジメチルホルムアミド (59ml) に溶解し*

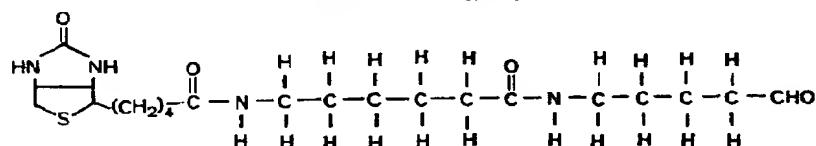
* (95°C)、さらに、カルボジイミダゾール (0.476g) を溶解したN, N-ジメチルホルムアミド (14.7ml) を加え、95°Cで30分間反応した。反応液を室温に戻し、2時間攪拌し、N-ヒドロキシスクシンイミド (0.29g) を添加し、室温で1昼夜反応させた。引続き、反応液を蒸発乾固し、残査を2-ブロバノールで再結晶させて、ビオチン-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドを得た。

【0051】これに、実施例2に示したように、アミノペンタノールを結合させ、また同様に酸化反応を用いて、ビオチン-アミノカプロン酸-アミノペンタナルを生成し、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製した。

【0052】以上のように、本発明のビオチン導入試薬である下記化学式(化6)で示されるビオチン-アミノカプロン酸-アミノペンタナルを得た。

【0053】

【化6】



【0054】実施例4

λDNA/Hindのビオチン標識反応。λDNA/Hindを10mMリノ酸緩衝液 (pH7.7) に溶解し、100°C 5分間加熱後、急氷冷し変性DNAを得た。これに、実施例3に記載の方法により調製したビオチン-アミノカプロイル-アミノペンタナル溶液を加え、37°Cで10分間インキュベーションした後、反応液を“セファデックスG-50” (ファルマシア社製ゲル濾過クロマトグラフィー用担体) にかけ、精製標識DNAプローブを得た。得られた標識DNAプローブは、そのままハイブリダイゼーションに供するか、もしくは-20°Cにて使用時まで保存した。

【0055】実施例5

標識DNAプローブとのハイブリダイゼーション形成。λDNA/Hindの種々の量をアガロース電気泳動 (0.8% ゲル) により分離し、サザンらの方法 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (J. Mol. Biol.) 98巻、503ページ、1975年] に従って、DNAをニトロセルロースあるいはナイロンメンブレン上に転写した

(サザントランスファー)。このように入DNA/Hindを固定した膜を、ハイブリダイゼーション溶液 [50% 脱イオニホルムアミド (deionized formamide), 6×SSC (1×SSC; 0.15M NaCl, 0.15mM クエン酸三ナトリウム), 5×デンハルト溶液 (1×デンハルト溶液; 0.02%牛血清アルブミン (Fraction V), 0.02% フィコール, 0.02% ポリビニルピロリドン, 0.5% SDS, 0.01M EDTA (pH 8.0), 0.1mg/ml サケ精液DNA (超音波処理済み)] 中で、42°C、2時間プレハイブリダイゼーションし、実施例4に記載した方法で調製したビオチン標識プローブを添加したハイブリダイゼーション溶液で、42°C、20時間ハイブリダイゼーションを行った。さらに膜を、2×SSC, 0.1% SDS で洗浄 (室温で5分間づつ3回) し、さらに、0.2×SSC, 0.1% SDS で洗浄を (室温で5分間づつ3回、および、55°Cで15分間づつ3回) 行った。

【0056】実施例6

ビオチン標識DNAの検出。実施例5に記載された方法でハイブリダイゼーションおよび洗浄を終えた膜上の、ビオチン標識DNAを、次の方法で検出した。

11

【0057】つまり、ブロッキング溶液 [1%スキムミルク、0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)、0.15M NaCl] で90分間ブロッキングし、ビオチン-アビジン-アルカリホスファターゼ複合体を同溶液中で1時間反応させた。続いて、膜を洗浄液 [0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5)、0.15M NaCl、2.5mM MgSO₄、0.5% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、0.05% ポリエチレングリコール・モノ-p-イソオクチルフェニルエーテル] で洗浄した（5分間づつ、3回）。

【0058】さらに、洗浄液 [0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH9.5)、0.1M NaCl、10mM MgSO₄] で洗浄（2回、各10分間）後、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) および5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸p-トルイジン塩 (BCIP) の発色系により発色させた。この呈色を写真または写真複写にて記録し、膜は乾燥後保存した。

【0059】実施例7

ビオチン-アミノカプロイル-N-ヒドロキシスクシニミドとの比較。実施例4に従って識した標識DNA/Hindをアガロース (0.8%) 電気泳動した。一方、比較として、市販品のビオチン-アミノカプロイル-N-ヒドロキシスクシニミドを同量使用し標識したものを対照とした。電気泳動後、ゲルを0.2M HClで脱プリン反応し（20分間）、0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) で中和した後、ナイロンメンブレンにサザントランスマークした（18時間）。

【0060】トランスマーク終了後、メンブレンを6×SSC ですすぎ、80°Cで30分間ベーキングした。以下検出は、実施例5および実施例6に記載の方法により行った。この結果、標識時間を10分間とした場合、実施例3で合成したビオチン-アミノカプロイルアミノペプチナールで標識したDNA/Hindは、ビオチン-アミノカプロイル-N-ヒドロキシスクシニミドで標識した場合と比較して、10倍以上の高感度検出が可能であり、数ピコグラムの核酸検出が可能であった。

【0061】実施例8

抗体のビオチン標識方法および抗原の検出。抗アルブミン抗体（10mg/ml）を磷酸緩衝液 (10mM, pH7.7) に溶解し、これに実施例3に記載の方法により調製したビオチニ-アミノカプロイルアミノペプチナール溶液を加え、37°Cで1時間反応させ、反応液を透析後、ビオチン化抗アルブミン抗体を得た。

【0062】ヒト血清アルブミンをポリアクリルアミド電気泳動し、PDAV (ポリビニリデン・ジフルオリド) 膜に転写した。この膜を、2%スキムミルクを含むTBS (20mM Tris-HCl, 0.15M NaCl, pH7.4) 溶液でブロッキングし、上記のように作成したビオチン化抗アルブミン抗体を同液中で作用させた。さらに、洗浄液 (0.05% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートを含むTBS溶液) で膜を洗浄後、アビジン-アルカリホスファターゼと反応させ、同様に洗浄した。続いて、この膜を実施例6に記載の方法により検出を行った。

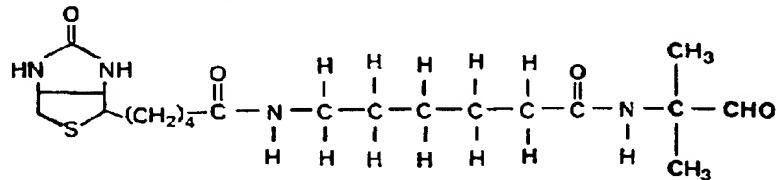
【0063】この結果、実施例3で合成したビオチニ-アミノカプロイルアミノペプチナールで標識したビオチン化抗アルブミン抗体を用いたアルブミンの検出では、アルブミン量として、数十ピコグラムでの検出が可能であった。

【0064】実施例9

分岐鎖のあるスペーサー基を有するビオチン導入試薬の合成。分岐鎖のあるスペーサー基を用いたときの例として、以下のスペーサー基を用いてビオチン誘導体を合成した。つまり、実施例1および実施例3に記載の方法により合成したビオチニ-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシニミド (Biotin-aminocaproyl-N-hydroxysuccinimide) と分岐鎖のある例として2-アミノ-2-メチル-1-ブロボノール (NH₂-(CH₂)₂-CHCH₂OH) とを実施例3に記載と同様な方法により結合させ、さらに同様に酸化反応を行い目的の本発明のビオチン導入試薬である下記化学式 (化7) で示される誘導体を得た。この誘導体を実施例7に示した方法でDNAを標識し、検出を行った。この結果、標識DNAとして数十ピコグラムの検出が可能であった。

【0065】

【化7】



【0066】実施例10

芳香族環のあるスペーサー基を有するビオチン導入試薬の合成。芳香族環のあるスペーサー基を用いたときの例として、p-アミノベンジルアルコール (NH₂-(C₆H₄-CH₂-OH)) を用いて、実施例9に記載と同様な方法により、ビオチン導入試薬である下記化学式 (化8) で示

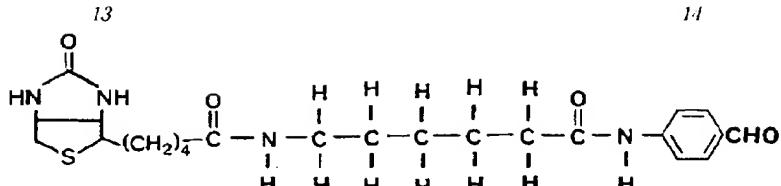
されるビオチン誘導体を合成した。この誘導体を実施例7に示す方法でDNAを標識し、検出を行ったところ、標識DNAとして、数十ピコグラムの検出が可能であった。

【0067】

【化8】

(8)

特開平6-92968



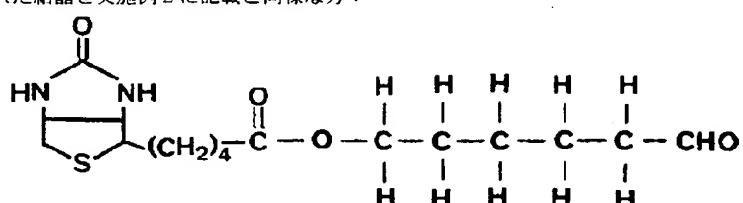
【0068】実施例11

エステル結合を介してスペーサー基と結合しているビオチン導入試薬の合成。ビオチン1gをN,N-ジメチルホルムアミド(100ml)に溶解させ、これに1,6-ヘキサンジオール(2.36g)を加え、さらに硫酸(1ml)を加え、1.5時間還流した。水酸化ナトリウムで中和した後、溶媒を減圧蒸留した。残渣を2-プロパノールで再結晶した。得られた結晶を実施例2に記載と同様な方*

*法によって酸化し、目的の本発明のビオチン導入試薬である下記化学式(化9)で示されるビオチン誘導体を合成した。この誘導体を実施例7に示す方法でDNAを標識し、検出を行ったところ、標識DNAとして、数十ピコグラムの検出が可能であった。

【0069】

【化9】



【0070】

【発明の効果】本発明は、短時間で、効率よく、核酸お

よび／またはタンパク質にビオチンを標識することでの
きるビオチン導入試薬を提供できる。